

赤潮生物检测的分子探针技术研究进展*

侯建军^{1,2}, 陈纪新¹, 黄邦钦¹

赤潮(Red Tide)也称有害藻华(HAB),是由于海域环境条件的改变,致使某些单细胞浮游生物爆发性繁殖,引起水色异常的生态现象。海洋中 HAB 藻类的爆发性增殖并通过食物链转化,对海洋生态环境、水产养殖业和人类健康安全产生直接或间接的危害,尤其是产毒赤潮。在赤潮毒素检测的上游即在赤潮发生之前监测赤潮生物尤为重要。赤潮监测大多采用传统的分类学技术如显微镜等,但由于赤潮生物(藻)形态的相似性和复杂性,使传统检测方法如光学显微镜在实际应用中存在困难,电子显微镜耗时、昂贵,难以在基层监测和防疫部门推广。分子探针技术具有快速、准确、专一性强等特点,特别是目标生物在复杂生物群落中不占优势或者有大量背景噪音干扰情况下,分子探针技术优势尤显突出。针对不同赤潮藻种,目前主要有 3 种探针,抗体、寡核苷酸和细胞凝集素(Lectin)探针,能够快速准确地鉴定、计数赤潮种类。现对赤潮生物检测的分子探针技术研究进展作一综述。

1 寡核苷酸探针技术

1.1 核酸特异性探针的获取 寡核苷酸探针技术最初是用于检测病原性细菌或其它微生物,目前也应用于赤潮藻类的监测^[1,2]。核酸探针的应用方式主要有两种:(1)通过荧光原位杂交的方法(全细胞杂交),将完整的细胞置于玻片上或试管悬浮液中,探针进入细胞,没有结合的探针被洗去,目标细胞通过探针上标记的荧光基团来检出;(2)膜杂交。将提取的 DNA 固定于膜上,加入探针,进行杂交,通过放射性、荧光、化学发光或分光的方法来检测,现成为 Sandwich 杂交^[3]。有两种主要途径获得所需的赤潮藻类目标 DNA 或 RNA 序列:(1)通过互联网上各大核酸数据库或专门数据库,从中获得部分所需的赤潮藻类基因^[2]。(2)在纯化培养的藻种中用设计的引物扩增目的基因。利用蛋白数据库或其它大分子数据库已有的特异性氨基酸序列分析、设计其基因引物,对赤潮藻种进行扩增得到相应基因。如一些赤潮毒素其有毒株与无毒株的差异均具有毒素基因,但在毒素合成酶基因上具有差异(如微囊藻),对此可将毒素合成酶基因作为靶序列。对扩增出的基因序列进行测序得到相应的核苷酸序列,将得到的特异性序列通过 BLAST、FASTA 等程序对互联网上各大核酸数据库进行匹配性与相似性测试,以筛选出数种所需特异性探针^[3]。

1.2 荧光探针的标记

1.1 探针标记时可采用两种基本方式:(1)直接标记法:将荧光分子直接在荧光显微镜下检测。这种方式快速简捷,结果背景干扰很少,但杂交信号较弱,且不能进一步放大,因此,

目前已较少采用。(2)间接标记法:采用中间分子标记探针,杂交后再用荧光分子标记的中间分子的亲和物或抗体进行检测^[3]。目前采用的中间分子有:生物素、地高辛配基、2-乙酰氨基苄、二硝基苯酚、汞分子和硫化基团。其中前两者以标记核苷酸类似物的形成被掺入探针的,因此,可以采用常规的缺口平移法、随机引物法、PCR 或 RNA 体外转录法进行标记。标记后探针长度应为 200~400 bp,以保证最佳杂交效果^[4]。

1.3 建立杂交体系 合成并荧光标记特异性探针后,通过全细胞杂交(荧光原位杂交)或膜上斑点杂交来检测探针的特异性,然后建立 Sandwich 的杂交体系^[2]。用筛选得到的 2 个特异性探针,一个探针固定于固体表面,它通过特异性与目标核酸中对应序列结合将目标核酸从细胞粗裂解物(无需提取 DNA)捕获后,另一个特异性探针再结合于目标核酸的不同位置,探针带有能够提供色彩或化学发光的基团供检测,通常采用地高辛标记,加入带 HRP 基团的抗体与地高辛结合后,使加入的底物发生显色反应,通过显微镜、肉眼观察定性检测或用分光仪器定量检测^[3,4]。

1.4 应用现状 Adachi 等^[1]通过 5.8 s rDNA 分析方法, Scholin 等^[5]应用 PCR 扩增的核糖体大亚基(LSU) rDNA 的限制性片段长度多态性(RFLP)分析方法,对亚历山大藻的种类和株系进行了分子鉴定,并使用以大片 rRNA 限制性片段长度多态性(LSU rRNA)作为目标序列的寡核苷酸探针,对藻种进行鉴定,以硅藻 *Pseudo-nitzschia* 作为例子,使用两种方法进行杂交:用全细胞杂交后,将包含探针的细胞通过荧光显微镜鉴定;Sandwich 杂交后,用比色反应来确定结合在初始序列上目标基因丰度。总之,赤潮藻分子探针的相关研究尽管多,但仍存在如下问题:(1)已被研究的种类还很有限;(2)所采用的方法不一致,结果不易比较;(3)多数研究属分子系统学或分子分类学方面的内容,实用型或能用于现场检测的分子探针技术应用不多。

2 免疫荧光探针技术

2.1 技术内容及方案 免疫荧光探针的应用主要有:(1)对微型生物进行分类、识别,并可监测其数量变化;(2)标记细胞,量化微型生物吸收、利用营养的速度;(3)定位和量化细胞成分,如酶、毒素、结构蛋白、多聚糖等^[6,7]。特异性免疫荧光探针研制和应用的基本程序如下:(1)分离纯化培养赤潮海域的有害赤潮藻种;(2)特异性蛋白(如糖蛋白、毒素等)的分离提取;(3)用特异性蛋白或相应载体免疫动物或用整体细胞和细胞破碎物免疫动物;(4)抗体的分离、提取、纯化;(5)交叉实验及实际检测;(6)研制现场检测试剂盒。其中最重要的技术环节是免疫探针的制备如单克隆、多克隆抗体的分离提取以及检测^[7]。

2.2 多抗 微型生物细胞壁或者细胞内部结合有特异性蛋白,可用全细胞或者细胞不溶物(insoluble cellular fraction, ICF)作为抗原,将其接种于脊椎动物,如兔子、老鼠、羊等的体内,利用动物免疫系统产生含有针对特异蛋白的抗血清^[8]。

*基金项目:国家重点基础研究发展 973 规划项目(001CB409704); 国家自然科学基金资助(40076031)

作者单位:1. 厦门大学环境科学教育部重点实验室 环境科学研究中心,厦门 361006;2. 湖北民族学院医学院生化教研室。

作者简介:侯建军(1967-),男,土家族,湖北恩施人,副教授,博士,主要从事环境科学和分子生态学研究。

通讯作者:黄邦钦

多克隆抗体由于其抗血清中含有多种抗体,可以结合到目标生物细胞壁上的不同位点,则更易被检测^[7]。也正是由于其含有多种抗体,交叉反应较多,易产生假阳性反应,需对抗血清进行预吸附。其血清量有限,不能大量生产,其应用受到较大限制^[6,7]。

2.3 单抗 单克隆抗体具有纯度高、特异性强的特点,可提高免疫荧光探针检测目标生物的敏感性及其特异性。由于杂交瘤细胞可在体外进行大量无限制扩繁,从而产生大量单抗。单克隆抗体正逐渐取代多抗,在微型生物分类和监测中具有很强的应用前景。缺点是单克隆抗体的制备比较麻烦和困难^[9]。

2.4 目标生物的标记及检测 免疫荧光探针标记微型生物主要有两种方法:直接免疫荧光标记和间接免疫荧光标记。直接免疫荧光标记特点如下:(1)直接与抗原进行反应,具有较低的背景荧光信号;(2)所需反应物少,可减少背景噪音,节省成本;(3)洗脱步骤少,操作简单。直接免疫荧光标记对定量而言十分重要。缺点是抗体和荧光标记复合物受细胞膜电荷和结构限制,以及细胞结构对细胞内部特异性抗原决定簇的屏蔽,减小反应灵敏性。间接免疫荧光标记则可有效避免这些问题,增加荧光标记强度^[9]。免疫荧光探针标记的微型生物可用荧光显微镜或结合流式细胞等技术来检测。减小背景及阴性细胞荧光信号,对阳性细胞的检测十分重要,因其检测主要是通过阳性细胞与背景和阴性细胞荧光的差异进行识别。影响背景荧光信号的因素如下:滤光片、固定剂、抗体交叉反应或抗体的非特异性结合^[5,7,9]。

2.5 赤潮藻的酶联免疫吸附(ELISA)测定 免疫分析方法主要包括放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、发光免疫分析(LIA)、荧光免疫分析(FIA)和时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)等^[6,7,9]。其中 ELISA 是当前广泛应用的方法。其优点有:对抗体亲和力要求不很高;灵敏度和可测阈比 RIA 高 5 到 10 倍;具有很高特异性;反应快,短期保温即可。

2.6 应用现状 免疫荧光探针技术目前主要应用于有害赤潮生物识别和监测上,目前已开发出很多赤潮种类特异性非常显著的单抗与多抗探针。免疫荧光探针技术可以在很低浓度下对目标生物进行检测,其显著优点是结合流式细胞技术等,对目标生物进行自动计数,实时监测目标生物生长。如针对 *G. mikimotoi* 开发出的系列单克隆抗体探针,应用于纯培养藻类和自然水体,结合流式细胞仪的检出低限为 1000 cell/L^[6,7],而在荧光显微镜下仅能检出每升 100 个细胞,此法已用于荷兰海域 *G. mikimotoi* 的常规检测。Anderson 等^[10]利用 *A. anophagefferens* 特异性免疫荧光探针,可在 10~20 cell/ml 下将目标物种检出。如此低的浓度很难利用显微镜技术对其进行检测,此前在赤潮发生海区中还没有检出该藻种。这种抗体已经应用于常规的赤潮种监测。赤潮毒素单抗对其它类型毒素或异构体有可能发生交叉反应,应用酶联免疫法时容易产生假阳性。

3 lectin 探针技术

3.1 lectin 探针的技术方案 细胞凝集素(Lectin)是一类非免疫源性的糖结合蛋白或糖蛋白,有聚集细胞的活性,可以非共价特异性地结合细胞表面的单糖或寡糖等糖基^[11,12]。目前可从如下方面来展开相关工作:(1)各种赤潮藻 Lectin 的凝集活性及其受体的初步检测:可用天然和经过酶修饰的若干种红细胞,对实验室培养的赤潮藻类进行 lectin 凝集活性检

测,并检测赤潮藻中 lectin 类似物及 lectin 受体的存在和特异性^[11]。(2)lectin 的分离纯化,性质鉴定:对含有较高细胞凝集活性的藻类进行 lectin 的分离、提取、纯化和性质鉴定等工作,基本的技术路线为:样品缓冲液提取 离心 硫酸铵沉淀 离心 透析 亲和层析,所得产物为蛋白或糖蛋白(Glycoprotein)^[13]。(3)不同藻类 lectin 特异性结合条件、规律和机制研究。用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 lectin 检测不同生长阶段、不同生理状态和不同培养条件下的不同赤潮藻类,研究 lectin 特异性结合的规律和机制,探讨 lectin 与不同藻特异性结合的条件。(4)大量对实验室纯培养和自然水体的藻类进行检测,对亲源关系较近或形态上相似的种类用 lectin 探针进行识别和区分,验证探针的特异性。(5)结合流式细胞仪,在荧光标记的基础上,对赤潮藻进行分子鉴定、定量分析、分类及自动识别,鉴定和分选形成赤潮的浮游生物种类或种别,建立和优化 lectin 探针检测的技术体系^[11~14]。

3.2 lectin 作为探针的应用 研究发现,使用 FITC 标记的 Lectin 可区分海洋中的甲藻^[11~13]。Cho 等^[15]在韩国近岸水域用 FITC 标记的 lectin 探针在荧光显微镜下检测出了几种有害赤潮藻。Lectin 还可以区分同一种藻的不同克隆,它们被用于分辨形态相似的 *Gymnodinium catenatum* 有毒和无毒株^[13]。Rhodes 等应用细胞凝集素来区分形态学很相似的 *G. mikimotoi* 的日本株、新西兰株和韩国株,并应用细胞凝集素将 7 种 *Pseudonitzschia* 中的 6 种区分开来^[15]。用不同属或种的 *Dinophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Prymnesiophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae* 株系作为实验材料,用荧光标记的 10 种 lectin 在荧光显微镜下鉴别和分离了这些单细胞藻类^[13]。用 7 种荧光标记的 lectin 研究 101 份样本中包括 89 种真核和原核藻类细胞表面糖复合物的分布,显示 lectin 不同的结合特征,反应各物种细胞表面糖结构的特异性及生化多样性^[11]。Rodas 等^[15]还用 lectin 探针结合抗体技术研究了 *Microcystis* 自然种群中 3 个不同的形态种,表明探针的结合不受诸如细胞分裂周期、生长阶段、环境因子如培养介质、光照、温度等因素的影响,其结合对每一个种都具特异性。探针指示相同形态种存在着地理差异,西班牙株 *Microcystis aeruginosa* 和丹麦株 *M. aeruginosa* 相比,其有着完全不同的抗体和 lectin 结合位点。

4 展望

分子探针技术综合应用了免疫学和分子生物学方法来对目标生物进行检测和鉴定,它具有强的专一性、灵敏性和操作简单的特点,目前越来越多地应用于实验室或现场对赤潮生物进行快速、准确的检测和定量,采用基于客观的分子基础(核酸、蛋白、糖蛋白)的检测方法将随着监测的需要而得到普及。这些特异性的 DNA(RNA),肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)分子或蛋白质分子(抗体、lectin)探针,结合流式细胞仪还能对赤潮生物进行自动识别、定量和分子鉴定。在应用方面可对有害赤潮藻种的种群动态过程进行常规监测,预测有害赤潮发生的潜在可能性。并能在此基础上开发出半自动或自动检测仪器,简化检测人员的操作要求,甚至可以研制出水下自动监测仪器,实现对赤潮高发地区的全自动全面监测。虽然应用分子探针来检测赤潮有着重要的前景,但大部分工作还处在实验室的探针设计和开发之中,这些技术应用于现场监测还处于初始阶段,应用的例子也十分有限。除了少量赤潮藻株的细胞凝集素和 Sandwich 杂交检测试剂盒外,大

部分赤潮种类尚未有商业化探针产品,缺少简单方便的检测试剂盒。这些都限制了这些工具在海洋赤潮监测领域工作中的实际应用。同时这些探针也存在着一些不足和弱点,探针在必要时还需结合显微镜技术,并且需要多种探针进行检测,因为每一种探针都有其局限性。

参考文献:

- [1] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (*Dinophyceae*) species using sequences of the 5.8 s ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions[J]. J Phycol, 1996, 32: 424 - 432.
- [2] Miller P E, Scholin C A. Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudonitzschia* (*Bacillariophyceae*) using species - specific LSU rRNA - targeted fluorescent probes and filter - based whole cell hybridization[J]. J Phycol, 1998, 34: 371 - 382.
- [3] Macario A J L, Macario E C. Gene probes for Bacteria[M]. Academic press, sandiego. 1990, 515 - 530.
- [4] Hannen E J, Lurling M, Donk E. Sequence analysis of the ITS - 2 region: a tool to identify strains of *scenedesmus* (*Chlorophyceae*) [J]. J Phycol, 2000, 36: 605 - 607.
- [5] Scholin C A, Anderson D M. Identification of *alexandrium* species and strains using RFLP analysis of PCR - amplified LSU rDNA [R]. In Yasumoto T, Oshima Y, and Fukuyo Y. (eds), Harmful and toxic algal blooms. Intergovernmental oceanographic commission of UNESCO, 1996, 451 - 454.
- [6] Vrieling E G, Anderson D M. Immunofluorescence in phytoplankton research: application and potential[J]. J Phycol, 1995, 32: 1 - 16.
- [7] Vrieling E G, Vriezolk G, Gieskes W W C, et al. Immuno - flow cytometric identification and enumeration of the ichthyotoxic dinoflagellate *gyrodinium aureolum* huburt in artificially mixed algal populations[J]. J Plankt Res, 1996, 18: 1503 - 1512.
- [8] Vrieling E G, Peperzak L, Gieskes W W C, et al. Monoclonal antisera: An immunochemical tool for the specific detection of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium* (*cf.*) *aureolum* and morphologically related *Gymnodinium* species[J]. Mar Ecol Prog Ser, 1994, 103: 164 - 174.
- [9] 哈洛 E, 莱恩 D. 抗体技术实验指南[M]. 沈关心, 龚非力, 译. 北京: 科学出版社, 2002. 67 - 208.
- [10] Anderson D M, Keafer B A, Kulis D M, et al. An immunofluorescent survey of the brown tide chrysophyte *Aureococcus anophagefferens* along the northeast coast of the United States [J]. J Plankton Res, 1993, 15: 563 - 580.
- [11] Hori K T, Ogata H K, Mimuro M. Lectin - like compounds and lectin receptors in marine microalgae: haemagglutination and reactivity with purified lectins[J]. J Phycol, 1996, 32: 783 - 790.
- [12] Waite A M, Olson R J, Dam H, et al. Sugar - containing compounds on the cell surfaces of marine diatoms measured using concanavalin A and flow cytometry[J]. J Phycol, 1995, 31: 925 - 933.
- [13] Hori K, Matsubara K, Miyazawa K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga *Hypnea japonica* [J]. Biochimica Biophysica Acta (BBA)/ General Subjects, 2000, 1474 (2): 226 - 236.
- [14] Cho E S, Seo G M, Lee S G, et al. Application of FITC - conjugated lectin probes for the recognition and differentiation of some Korean coastal red tide microalgae[J]. J Fish Sci Tech, 1998, 1 (2): 250 - 254.
- [15] Rodas V, Costas E. Characterization of morphospecies and strains of *Microcystis* (Cyanobacteria) from natural populations and laboratory clones using cell probes (lectins and antibodies) [J]. J Phycol, 1997, 33: 446 - 454.

收稿日期: 2004-03-15

(蔡天德编辑 李溪莹校对)

文章编号: 1001-0580(2004)09-1129-01

中图分类号: R155.3⁺1

文献标识码: B

【基层公共卫生】

一起腊样芽胞杆菌引起的食物中毒

李昕¹, 王建²

2003 年 6 月 28 日, 我市某学校食堂发生一起 19 名学生食物中毒事件。根据流行病学调查、现场卫生学调查、临床表现及实验室检验资料, 判定是一起腊样芽胞杆菌引起的食物中毒。现将调查报告如下。

流行病学调查 2003 年 6 月 28 日午后, 该校食堂有 48 名学生就餐, 1 h 后 19 名学生陆续发病, 罹患率为 39.58%。通过对发病与未发病者进食情况的调查发现, 病例集中在食用隔夜米饭的人中, 不食用者不发病。食用了隔夜米饭的 35 名学生中有 19 人发病, 罹患率为 54.29%。经统计学检验, 食用隔夜米饭者与未食用者的罹患率比较有显著性差异 ($\chi^2 = 11.69, P < 0.005$)。由此判断该起食物中毒的原因为隔夜米饭。

经流行病学调查, 该校患病的 19 名学生在发病前 48 h 内无外出聚餐史, 当地无近期传染病流行史, 19 名患者的潜伏期为 1~4 h, 平均 2 h, 经对症治疗, 5 d 均痊愈, 无续发病例。

例, 无人与人之间的传播。从患者的发病时间分布曲线判定该起食物中毒是同源一次性的。

临床表现 19 名患者起病急剧, 最短的潜伏期 1 h, 最长为 4 h, 平均 2 h。主要临床表现为恶心 (78.95%)、呕吐 (68.42%)、腹痛 (26.32%), 少数有腹泻 (15.79%, 水样便) 及发热 (36.84%)。病程为 5 d, 经对症治疗均痊愈, 无续发病例, 无人与人之间的传播。符合细菌性食物中毒的临床表现和流行病学特点, 提示该起食物中毒的致病因子为腊样芽胞杆菌。

现场卫生调查 该学生食堂只有一个加工间, 主、副食加工交叉进行。防蝇、防鼠设施均不健全。6 月 27 日晚所剩的饭、菜未冷藏, 在室温 (30℃) 下保存至第 2 d 中午, 食用前在笼屉上加热约 5 min。

实验室检验 在剩余米饭中检出腊样芽胞杆菌, 活菌计数 $> 10^5$ /g。该结果证实, 此次食物中毒的致病因子为腊样芽胞杆菌。

作者单位: 1. 辽宁省抚顺市卫生监督所, 113006; 2. 辽宁省沈阳市沈河区卫生监督所

作者简介: 李昕 (1968 -), 女, 抚顺人, 副主任医师, 学士, 主要从事食品卫生监督管理工作。

收稿日期: 2004-03-31

(任旭红编校)